

3-OH-K und 3-OH-A sind bei neutralem und bei alkalischem pH sehr instabil, so daß bei einem z. B. durch Sulfonamidmedikation alkalisch reagierenden Harn eine Abnahme der Konzentration bereits in der Blase vorkommen kann. Sehr niedrige Harnwerte sind dadurch erklärbar (11).

Aus diesem Grunde ist auch die Bestimmung der sogenannten „endogenen 3-OH-A“ (Tab. 2) notwendig, denn diese kann in ihrer Konzentration wäh-

rend der Inkubation mit Kynureninase (3 Stdn.) abgenommen haben. Eine kürzere Inkubationszeit für die Kynureninasereaktion ist unter unseren Bedingungen nicht möglich, da sonst ein vollständiger Umsatz des 3-OH-K nicht gewährleistet ist. Durch Verwendung aktiverer Enzympräparate könnte jedoch eine kürzere Inkubationszeit erreicht werden.

Wir danken der Wissenschaftlichen Forschungsstelle im Verband der Cigaretten-Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

1. MUSAJO, L., A. SPADA und D. COPPINI, J. biol. Chemistry 196, 185 (1952). — 2. MUSAJO, L. und C. A. BENASSI, Adv. clin. Chem. 7, 63 (1964). — 3. BOYLAND, E., in: D. M. WALLACE (ed.), Tumours of the bladder. S. 83. E. & S. Livingstone Ltd, Edinburgh-London (1959). — 4. SCHIEVELBEIN, H. und E. BUCHFINK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 18, 291 (1967). — 5. BONNER, D. M. und CH. YANOFKY, Proc. nat. Acad. Sci. USA 35, 576 (1949). — 6. KUSS, E., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 195 (1966). — 7. WEBER, F. und O. WISS, in: Hoppe-Seyler-Thierfelder (Hrsg).

Physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse, 10. Aufl. Bd. VI/B, S. 806. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966). — 8. WISS, O., Z. Naturforsch. 11b, 54 (1956). — 9. WEBER, F. und O. WISS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 232 (1956). — 10. WISS, O., H. SIMMER und H. PETERS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 221 (1956). — 11. PIPKIN, G. und J. U. SCHLEGEL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 120, 592 (1965). — 12. BENASSI, C. A., F. M. VERONESE und A. DE ANTONI: Clin. chim. Acta (Amsterdam) 17, 383 (1967).

Priv.-Doz. Dr. H. Schievelbein
8 München 15
Nußbaumstr. 20

Die Verwendung von o-Nitrophenylbutyrat als Fehlerquelle bei der Messung der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM¹⁾

VON M. GELDMACHER - V. MALLINCKRODT UND I. KAISER

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)

(Eingegangen am 2. Februar 1968)

Das Vorgehen von MAIN, MILES und BRAID zur Bestimmung der Serum-Cholinesteraseaktivität unter Verwendung von o-Nitrophenylbutyrat als Substrat ist nicht geeignet zur Messung der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM, da schon 2-PAM allein unter den Bedingungen der Reaktion das Substrat nichtkatalytisch unter Freisetzung von o-Nitrophenol spaltet.

The method by MAIN, MILES and BRAID for determination of human serum cholinesterase activity with o-nitrophenylbutyrate as substrate is not suitable for measuring activity after reactivation of alkylphosphate-poisoned serum cholinesterase by 2-PAM, since 2-PAM alone — under the conditions of the reaction — splits the substrate non-catalytically and liberates o-nitrophenol.

Die Aktivität der Serumcholinesterase kann zur Diagnose bestimmter Krankheitsbilder und von Vergiftungen mit Cholinesteraseblockern wie z. B. E 605 herangezogen werden. Methodisch stehen eine große Anzahl verschiedener Verfahren zur Verfügung, die nicht alle Acetylcholin als Substrat verwenden (siehe z. B. STUMPF (1), KOELLE (2)).

MAIN, MILES und BRAID (3) haben 1961 das o-Nitrophenylbutyrat als Substrat eingeführt. McCOMB, LAMOTTA und WETSTONE (4) empfehlen dieses Substrat zur Erkennung atypischer Serumcholinesterasen. SZASZ (5) hat einen kritischen Vergleich zwischen Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin und o-Nitrophenylbutyrat als Substrate zur Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung im Serum durchgeführt.

¹⁾ Abkürzungen: 2-PAM = Pyridin-2-aldoxim-N-Methyljodid
E 605 = Diäthyl-p-Nitrophenylthiophosphat, DFP = Diisopropylfluorophosphat, TEPP = Tetraäthylpyrophosphat.

Auf Grund des Vorkommens atypischer Serumcholinesterasen mit meist geringerer Aktivität (6), der starken intraindividuellen Unterschiede in der Aktivität der normalen Enzyme, des Einflusses von Krankheiten sowie der Möglichkeit einer Cholinesteraseblockierung nicht nur durch Alkylphosphate, sondern auch durch Carbamate und viele andere Medikamente haben FRIEDBERG und SAKAI (7) ein Verfahren zur *in vitro*-Reaktivierung alkylphosphatvergifteter Cholinesterasen mit 2-PAM ausgearbeitet. Sie empfehlen, mit einer beliebigen Methode die Aktivität ohne und mit 2-PAM-Zusatz zu prüfen. Ergebe sich durch 2-PAM eine Aktivitätssteigerung, so liege mit Sicherheit eine Vergiftung mit einem organischen Phosphorsäureester vor.

FRIEDBERG und SAKAI (7) selbst verwendeten die manometrische Methode von AMMON unter Benutzung der Warburg-Apparatur, als Substrat diente Acetyl-

cholin. SUCKER (8) hat die Möglichkeit der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Cholinesterase durch 2-PAM mit zwei weiteren Verfahren, nämlich der elektrometrischen Messung der pH-Wert-Änderung sowie der kolorimetrischen Bestimmung des unverbrauchten Substrates geprüft. Auch er arbeitete mit Acetylcholin.

Da die Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität mit o-Nitrophenylbutyrat nach MAIN, MILES und BRAID (3) einfach durchführbar ist und das Ergebnis innerhalb einer halben Stunde vorliegt, untersuchten wir, ob dieses System auch zur Messung der Reaktivierung des alkylphosphatgehemmten Ferments mit 2-PAM geeignet ist.

Methodik und Ergebnisse

Die Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität erfolgte nach MAIN, MILES und BRAID (3).

Reagenzien

0,5M Phosphatpuffer pH 7,6. Vor Gebrauch 1:10 mit Wasser verdünnen (0,05M).

0,5M methanol. o-Nitrophenylbutyrat-Stammlösung.

Butanol-Phosphatpuffer: 95 ml/ 0,05M Phosphatpuffer werden mit 5 ml/ Butanol gut geschüttelt.

o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung: 10 ml/ Butanol-Phosphatpuffer + 0,03 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Stammlösung.

Diisopropylfluorophosphat (DFP)-Lösung: 0,025M in iso-Propylalkohol.

Fermentlösung: 0,1 ml/ Serum oder Plasma in 25 ml/ eisgekühltem Butanol-Phosphatpuffer; nur 30 Min. haltbar.

50proz. Äthanol.

Arbeitsgang

Die Reaktion kann in Reagenzgläsern durchgeführt werden:

A (Probe)	L (Leerwert)
in diese gibt man:	
5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Puffer-Lösung	5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Puffer-Lösung
(jeder Ansatz enthält damit 7,5 µMol Substrat)	
—	0,05 ml/ DFP-Lösung
1 ml/ Fermentlösung	1 ml/ Fermentlösung
Beide Gläser werden im Wasserbad bei $25 \pm 0,1^\circ$ genau 30 Min. inkubiert. Sodann erfolgen sofort die folgenden Zusätze:	
0,05 ml/ DFP-Lösung	—
50proz. Äthanol ad 10,0	50proz. Äthanol ad 10,0

Anschließend wird in 1 oder 2 cm-Küvetten die Extinktion von A bei 414 nm gegen L als Leerwert gemessen.

MAIN, MILES und BRAID (3) bestimmen die Menge des in Freiheit gesetzten o-Nitrophenols spektrophotometrisch. Da der pK-Wert von o-Nitrophenol bei 7,1 liegt, überwiegt bei dem pH-Wert des Inkubationsansatzes von 7,6 die ionisierte Form, die ein Absorptionsmaximum von 414 nm aufweist. o-Nitrophenylbutyrat zeigt bei pH 7,6 praktisch keine Absorption bei 414 nm. Die o-Nitrophenol-Konzentration erwies sich bis zu einem Extinktionswert von 1,5 als lineare Funktion der Extinktion.

FRIEDBERG und SAKAI (7) verwendeten zur Reaktivierung alkylphosphatvergifteter Cholinesterasen 2-PAM in einer Konzentration von 10^{-3} M. Bei orien-

tierenden Versuchen mit Aktivitätsbestimmung von durch Systoxsulfoxyd¹⁾ in vitro gehemmter Serumcholinesterase nach MAIN, MILES und BRAID (3) stellten wir fest, daß nach Hinzufügen von 2-PAM (wir verwendeten ein Präparat der Firma Bayer, Leverkusen, mit einem Schmelzpunkt von 215—216°) zu dem Analysenansatz teilweise sehr viel höhere Extinktionen gemessen wurden als für das betreffende Humanserum vor Vergiftung und Reaktivierung. Deshalb wurde zu 5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung nur 2-PAM in 1 ml/ Wasser gegeben. Sofort nach Zugabe der 2-PAM-Lösung färbte sich der Reaktionsansatz gelb, ohne daß ein Serumzusatz erfolgt war. Das Absorptionsmaximum der Lösung lag bei 414 nm. Die wäßrige 2-PAM-Lösung sowie die o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung allein waren praktisch ungefärbt. Diese Ergebnisse legten den Gedanken nahe, daß 2-PAM allein in der Lage ist, aus o-Nitrophenylbutyrat eine gelb gefärbte Verbindung, wahrscheinlich o-Nitrophenol, in Freiheit zu setzen.

Qualitative Untersuchung des Reaktionsproduktes

Die qualitative Untersuchung der durch 2-PAM-Zugabe gelb gefärbten Lösung von o-Nitrophenylbutyrat in Phosphatpuffer pH 7,6 erfolgte dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Kieselgel G (Merck) und Toluol als Laufmittel. Zur Detektion wurde mit 2N NH_4OH oder NaOH besprüht, wobei sich o-Nitrophenol sofort stark gelb, der Ester zunächst schwach gelb, dann zunehmend stärker anfärbte.

Die R_F -Werte betrugen für

o-Nitrophenylbutyrat	0,28
o-Nitrophenol	0,49

Folgende Ansätze wurden hergestellt:

- 5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung + 1 ml/ Wasser
- 5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung + 1 mg PAM in 1 ml/ Wasser.

Die Ansätze wurden 30 Min. bei 25° gehalten, sodann mit Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknete Ätherphase wurde eingedampft und der Rückstand mit Äthanol aufgenommen. Aliquote Teile hiervon wurden dünnschichtchromatographisch untersucht.

Dabei ergab sich, daß in Ansatz a) praktisch nur o-Nitrophenylbutyrat neben einer Spur o-Nitrophenol vorlag. Ansatz b) hingegen enthielt neben erheblich weniger o-Nitrophenylbutyrat eine größere Menge an o-Nitrophenol. Damit spaltet 2-PAM unter den genannten Bedingungen o-Nitrophenylbutyrat unter Freisetzung von o-Nitrophenol.

Zeitlicher Ablauf der Reaktion

Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion festzulegen, wurden jeweils 5 ml/ o-Nitrophenylbutyrat-Pufferlösung und 1 mg 2-PAM

¹⁾ Die Kurzbezeichnung Systoxsulfoxyd wird hier gebraucht für O,O-Diäthyl-S-2-(äthylsulfinyl)-äthylthiophosphat, Sarin für Methylphosphonsäure-fluor-isopropylester, Tabun für Dimethylamido-cyan-phosphorsäure-äthylester, Phosdrin für O,O-Dimethyl-O-(1-Carbamethoxy-1-propen-2-yl)-phosphat, Toxogonin für 1,1'-Oxydimethyl-bis-(4-Hydroxy-iminomethylpyridiniumhydroxyd).

in 1 ml/ Wasser bei 25° neben einem anstelle der PAM-Lösung nur Wasser enthaltenden Leerwert über verschiedene Zeiten inkubiert, sodann nach der Vorschrift von MAIN, MILES und BRAID (3) mit Alkohol auf 10,0 ml/ aufgefüllt und spektrophotometrisch bei 414 nm untersucht.

Zu den verschiedenen Zeiten wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Extinktionen (jeweils Mittelwerte aus vier Einzelbestimmungen) gemessen, die nach Abzug des Leerwertes praktisch alle den gleichen Zahlenwert aufweisen.

Tab. 1

Zeitlicher Verlauf der nichtenzymatischen Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat bei 25° in Phosphatpuffer pH 7,6 in Gegenwart und ohne 2-PAM

Inkubationszeit [Min.]	Extinktionen		B—C
	Ansatz (B) mit 2-PAM	Leerwert (C) ohne 2-PAM	
5	1,10	0,01	1,39
10	1,25	0,01	1,24
15	1,30	—	1,30
20	1,30	—	1,30
25	1,40	0,01	1,39
30	1,40	0,06	1,34
45	1,50	0,08	1,42
60	1,45	0,07	1,38
75	1,50	0,09	1,41
105	1,80	0,13	1,67
135	1,80	0,30	1,50
165	1,90	0,32	1,58
195	1,80	0,31	1,49

Daraus ergibt sich, daß die Freisetzung von o-Nitrophenol durch die angewandte PAM-Menge sehr schnell erfolgt. Der Endzustand ist schon nach höchstens 5 Min. erreicht.

Beziehung zwischen 2-PAM-Menge und abgespaltenem o-Nitrophenol

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der PAM-Menge auf die in Freiheit gesetzte Menge an o-Nitrophenol untersucht.

Hierzu wurde wie oben beschrieben vorgegangen, mit dem Unterschied, daß außer 1,0 mg auch 0,8, 0,6, 0,4 und 0,1 mg PAM in 1 ml/ Wasser dem o-Nitrophenylbutyrat-Puffergemisch zugesetzt wurden. Die Inkubationszeit bei 25° betrug 30 Min.

Die bei den einzelnen Ansätzen gemessenen Extinktionen (Mittelwerte aus je 4 Einzelbestimmungen) sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Umrechnung der Extinktionen in mg o-Nitrophenol erfolgte anhand einer entsprechenden Eichkuve.

Tab. 2

Abhängigkeit der abgespaltenen o-Nitrophenolmenge von der zugesetzten 2-PAM-Menge (Phosphatpuffer pH 7,6; 25°; Inkubationszeit 30 Min.)

2-PAM im Versuchsansatz mg	abgespaltene Menge o-Nitrophenol mg
1,0	0,365
0,8	0,290
0,6	0,225
0,4	0,160
0,1	0,040

Es ist zu erkennen, daß geringere PAM-Mengen auch geringere Mengen o-Nitrophenol in Freiheit setzen. In weiteren Ansätzen wurde geprüft, ob bei geringeren PAM-Mengen die Zeit der Bebrütung bei 25° einen

Einfluß auf die Abspaltung von o-Nitrophenol hat. Gemessen wurde jeweils die Extinktion nach 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Min. Bebrütungszeit. Es zeigte sich wie schon in den Versuchen mit 1 mg 2-PAM, daß Bebrütungszeiten über 5 Min. keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis haben.

Setzt man aus Tabelle 2 die im Ansatz enthaltene 2-PAM-Menge und die jeweils abgespaltene Menge an o-Nitrophenol, beide umgerechnet in mMol, miteinander in Beziehung, so ergeben sich die aus Tabelle 3 abzulesenden Quotienten:

Tab. 3

Beziehung zwischen eingesetztem 2-PAM und abgespaltenem o-Nitrophenol

Eingesetzte 2-PAM-Menge		abgespaltene Menge o-Nitrophenol		D/E
mg	mMol (D)	mg	mMol (E)	
1,0	0,0038	0,365	0,00264	1,47
0,8	0,003	0,290	0,00208	1,44
0,6	0,0023	0,225	0,00161	1,44
0,4	0,0015	0,160	0,00115	1,30
0,1	0,0004	0,040	0,00029	1,38

Aus der Tabelle ergibt sich, daß o-Nitrophenylbutyrat stets im Überschuß im Ansatz vorhanden war, und zwar 2—20fach. Weiter läßt sich ablesen, daß jede angewandte 2-PAM-Menge o-Nitrophenol im molaren Verhältnis 1,5:1 in Freiheit setzte.

Diskussion

2-PAM ist in der Lage, unter den von MAIN, MILES und BRAID (3) gewählten Bedingungen (Phosphatpuffer pH 7,6; 25°) o-Nitrophenylbutyrat unter Freisetzung von o-Nitrophenol zu spalten, und zwar im Verhältnis 1,5 Mol eingesetztes 2-PAM: 1 Mol o-Nitrophenol.

Diese Reaktion ist kein völlig vereinzelt dastehendes Phänomen. Es ist bekannt, daß eine größere Anzahl von Organophosphaten durch stickstoffhaltige Verbindungen gespalten werden können. WAGNER-JAUREGG und HACKLEY (9) zeigten z. B., daß die Hydrolyse von Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Diäthylfluorophosphat in Gegenwart von Imidazol, Histidin, Pyridin und anderen ähnlich gebauten Verbindungen schneller abläuft. Bei der Beschleunigung der Hydrolyse von DFP durch Histidin und Imidazol handelte es sich um eine echte Katalyse, da Histidin und Imidazol nicht aus dem Reaktionsansatz verschwanden. Die Autoren nahmen die Bildung einer intermediären Verbindung zwischen Dialkylfluorophosphat und den Katalysatoren an, die dann sekundär wieder zerfällt. JANDORF (10) hat die Spaltungsbeschleunigung insbesondere von Methylisopropylfluorophosphat (Sarin) in Gegenwart von Hydroxylamin untersucht. Sie verlief bei Raumtemperatur und pH 7,5 nicht katalytisch, sondern stöchiometrisch. WAGNER-JAUREGG (11) fand, daß die Freisetzung von Fluorwasserstoff aus Sarin auch durch verschiedene Hydroxamsäuren beschleunigt wird, ebenso stellten GREEN und SAVILLE (12) fest, daß in neutraler oder schwach alkalischer Lösung Oxime schnell mit Sarin reagieren und für jedes ge-

spaltene Sarinmolekül ein Mol Oxim verbraucht wird. GREEN, SAINSBURY, SAVILLE und STANSFIELD (13) beobachteten eine Beschleunigung der Spaltung nicht nur von DFP und Sarin, sondern auch von TEPP und Tabun durch verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen, insbesondere Hydroxamsäuren. GATTERDAM, CASIDA und STOUTAMIRE (14) stellten fest, daß die Hydrolyse von Phosdrin bei pH 9 etwa 3mal schneller verläuft, wenn Hydroxylamin oder verschiedene PAM-Derivate zugegen sind.

Quantitative Untersuchungen über die Abspaltung von Fluorwasserstoff aus DFP, u. a. durch Benzohydroxamsäure, Nicotinhydroxamsäure und Picolinhydroxamsäure stammen von HACKLEY, PLAPINGER, STOLBERG und WAGNER-JAUREGG (15). Sie zeigten, daß pro Mol freigesetztem Fluorwasserstoff 1,5–2 Mole der Hydroxamsäuren aus dem Reaktionsansatz verschwanden. Dies stellte klar, daß die Hydroxamsäuren nicht als wahre Katalysatoren wirken, sondern selbst verändert werden. Dabei entsteht O-Phenyl-carbamyl-benzohydroxamat, $C_6H_5-CONHOCONH-C_6H_5$, das isoliert und identifiziert werden konnte.

Bei der Reaktion von Sarin mit p-Methylbenzo-, p-Nitrobenzo-, p-Cyanobenzo-, Picolin- und Nicotinhydroxamsäuren wurden analoge Verbindungen erhalten.

Die genannten Organophosphatverbindungen können als einfache oder gemischte Säureanhydride aufgefaßt werden. Viele der aufgeführten stickstoffhaltigen Verbindungen, insbesondere die Oxime reagieren auch mit anderen Säureanhydriden wie z. B. Sulfonyl-Halogen-Verbindungen und Essigsäureanhydrid. Schon WERNER und PIGUET (16) hatten z. B. gefunden, daß eine alkalische Lösung von Benzilmonoxim mit Benzolsulfonsäurechlorid unter Spaltung des Säurechlorids reagiert.

HURD und BAUER (17) untersuchten die Spaltung von p-Toluolsulfonylchlorid mit Benzhydroxamsäure. Hierbei entsteht auch nach HACKLEY, PLAPINGER, STOLBERG

und WAGNER-JAUREGG (15) gleichfalls O-Phenyl-carbamylbenzohydroxamat, so daß letztere den gleichen Reaktionsmechanismus wie bei der Spaltung von DFP annehmen.

GREEN und SAVILLE (12) prüften die Reaktion zwischen Essigsäureanhydrid und Hydroxyiminoaceton in praktisch neutraler Lösung, die fast augenblicklich zur Freisetzung von einem Mol Essigsäure führt. Anschließend kommt es dann zu einer langsameren Abspaltung von Essigsäure aus dem gebildeten Oximacetat, wobei zwei weitere Mole Essigsäure und Blausäure entstehen. Der letztere Schritt läuft mit zunehmendem pH schneller ab.

Nach unseren Ergebnissen kann o-Nitrophenylbutyrat als gemischtes Säureanhydrid aufgefaßt werden, das durch 2-PAM in einer nichtkatalytischen Reaktion gespalten wird. Der Verbrauch von etwa 1,5 Mol 2-PAM für jedes in Freiheit gesetzte Mol o-Nitrophenol läßt an einen ähnlichen Reaktionsablauf denken, wie er von HACKLEY und Mitarbeitern (15) formuliert wurde. Aufgrund dieser Reaktion ist die Methode von MAIN, MILES und BRAID (3) für den Nachweis einer Reaktivierung alkylphosphatgehemmter Serumcholinesterase durch 2-PAM nicht brauchbar.

Ähnliche Verhältnisse sind bei allen Substraten zu erwarten, die keine echten Ester, sondern wie o-Nitrophenylbutyrat Säureanhydride sind, also z. B. Phenylbenzoat (1), Naphthylacetat und Indoxylacetat oder Acetylsalicylsäure (2).

Orientierende Versuche haben ergeben, daß eine zu o-Nitrophenol führende Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat auch mit Toxogonin eintritt.

Ein störungsfreier Verlauf ist zu erwarten, wenn Cholinester, insbesondere Acetylcholin Verwendung finden. Systematische Untersuchungen zu dieser Frage sind im Gange.

Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Literatur

1. STUMPF, CH., Z. Vitamin-, Hormon u. Fermentforsch. (Wien) 8, 36 (1956). — 2. KOELLE, G. B., Cholinesterase and anticholinesterase agents. Ergänzungswerk Band XV des Handbuchs der Experimentellen Pharmakologie. Hrsg. O. EICHLER und A. FARAH. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963). — 3. MAIN, A. R., K. E. MILES und P. E. BRAID, Biochem. J. 78, 769 (1961). — 4. Mc COMB, R. B., R. V. LA MOTTA und H. J. WETSTONE, Clin. Chem. (New York) 11, 645 (1965). — 5. SZASZ, G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1246 (1967). — 6. GOEDDE, H. W., A. DOENICKE und K. ALTLAND, Pseudocholinesterasen Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967). — 7. FRIEDBERG, K. D. und F. SAKAI, Dtsch. Zschr. gerichtl. Med. 47, 580 (1958). — 8. SUCKER, H., Enzymatische Methoden. in: GADAMERS Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, Bd. II. Hrsg. E. GRAF und FR. R. PREUSS. Van den Hoek und Rupprecht, Göttingen (1966). — 9. WAGNER-JAUREGG, T. und B. E. HACKLEY jr., J. Amer. chem. Soc. 75, 2125 (1953). — 10. JANDORF, B., J. Amer. chem. Soc. 78, 3686 (1956). — 11. WAGNER-JAUREGG, T., Arzneimittel-Forschung Aulendorf 6, 194 (1956). — 12. GREEN, A. L. und B. SAVILLE, J. Chem. Soc. (London) 1956, 3887. — 13. GREEN, A. L., G. L. SAINSBURY, B. SAVILLE und M. STANSFIELD, J. Chem. Soc. (London) 1958/II, 1583. — 14. GATTERDAM, P. E., J. E. CASIDA und D. W. STOUTAMIRE, J. econ. Ent. 52, 270 (1959). — 15. HACKLEY, B. E. jr., R. PLAPINGER, M. STOLBERG und T. WAGNER-JAUREGG, J. Amer. chem. Soc. 77, 3651 (1955). — 16. WERNER, A. und A. PIGUET, Ber. dtsch. chem. Ges. 37, 4295 (1903). — 17. HURD, CH. D. und L. BAUER, J. Amer. chem. Soc. 76, 2791 (1954).

Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
852 Erlangen,
Universitätsstr. 22